Münster 1937 No 174 Med DiSS

Aus dem Hygienischen Institut der Universität Münster i. Westf.
Direktor: Professor Dr. K. W. Jötten.

Vergleichende Untersuchungen über Anaerobenoberflächenkulturen

unter Berücksichtigung der speziellen Züchtungsverfahren von Zeißler, Fortner und Bachmann.

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Doris Wichmann

aus

Münster i. Westf.

Buch- und Kunstdruckerei Wilh. Postberg, Bottrop i. W.

1936

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 3. 1936.

Dekan: Professor Dr. K. W. Jötten.
Referent: Professor Dr. K. W. Jötten.
Korreferent: Dr. habil. H. Reploh.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizin. Fakultät der Westfälischen Wilhelmsuniversität Münster i. Westf.

Meiner Mutter gewidmet!

Die bakteriologische Diagnostik der anaeroben Mikroorganismen war gegenüber den anderen Gebieten der Bakteriologie jahrzehntelang in der Entwicklung stecken geblieben. Erst in den letzten Jahren ist die Technik der Anaerobenzüchtung und damit ihre Artbestimmung so vervollkommnet, daß sie inzwischen den Stand mancher anderer Gebiete der Bakteriologie erreicht bezw. überholt hat. Damit ist der für die Artbestimmung und Differenzierung notwendige Tierversuch, und die für viele andere Mikroorganismen noch nicht oder überhaupt nicht entbehrlichen serologischen Methoden, für die Anaerobier vollkommen überflüssig geworden. Aus dem schnellen Aufstieg der Anaeroben-Bakteriologie ist nun aber keineswegs der Schluß zu ziehen, daß das Gebiet der Anaeroben-Technik und damit deren Züchtung sehr einfach geworden sei. Vielmehr ist die Anaeroben-Methodik auch heute noch eins der schwierigsten Kapitel der Bakteriologie überhaupt.

Von den außerordentlich mannigfachen Züchtungsmethoden ist bis jetzt noch keine restlos befriedigend; wie immer da, wo viele Methoden angegeben werden, keine ganz vollkommen ist. Die zur anaeroben Technik notwendige Herstellung von sauerstoffreien Nährboden und einer sauerstoffreien Kulturatmosphäre kann auf die verschiedenste Weise mit zahlreichen Methoden erreicht werden. Es ist notwendig, den Sauerstoff sowohl aus dem Nährmedium als auch aus dem umgebenden Raume auszutreiben. Die Befreiung des Nährsubstrates vom Sauerstoff geschieht auf die einfachste Weise durch Austreiben der Luft mittels Kochen. Um eine sauerstoffreie Atmosphäre zu erzielen, muß entweder der Luftzutritt beschränkt werden — was z. B. im Koch'schen Glimmerplättchenverfahren geschieht — oder die Luft muß verdrängt werden. Dieses wurde bis jetzt erreicht durch Züchtung im Vakuum mittels Absaugen der Luft durch eine Pumpe oder mittels Verdrängung der Luft durch ein anderes Gas. Dasselbe muß natürlich indifferent für das Wachstum der Mikroorganismen sein. Da dieses im wesentlichen beim Wasserstoff der Fall ist, so bediente man sich des Kipp'schen Apparates, um die Luft zu verdrängen. Andererseits kann man aber auch den Luftsauerstoff im System durch chemische Mittel absorbieren lassen, wie es z. B. mit Pyrogallol und Kalilauge in der Absorptionsmethode von Buchner geschieht. Von speziellen Methoden der Anaerobenzüchtung seien noch die Zeissler- und Fortner'sche besonders erwähnt, auf die später im einzelnen noch eingegangen werden soll.

Die vergleichende Prüfung der verschiedenen Verfahren ergibt erhebliche Unterschiede, läßt also leistungsfähigere und weniger vollkommene Methoden unterscheiden. In geringerem Grade können die Ergebnisse aber auch von der verschiedenen Sauerstofftoleranz der einzelnen Bakterien beeinflußt sein.

Unter den modernen Methoden der Anaerobenzüchtung hat sich in letzter Zeit die Fortner-Anordnung mit einem Sauerstoffzehrer in Gestalt des Bact. prodigiosum gut bewährt. Es muß ohne weiteres zugegeben werden, daß sie gegenüber älteren Verfahren der Oberflächenzüchtung viele Vorteile hat, — sowohl rein technisch als auch kulturell, — zum mindesten aber diesen gleichwertig ist.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, die Leistungsfähigkeit der Fortner-Methode, bezw. der abgewandelten Bachmann'schen Versuche gegenüber der Züchtung nach Zeissler zu prüfen.

Die Versuche wurden so angesetzt, daß jeweils eine Plattenserie nach den Angaben von Bachmann und gleichzeitig Kontrollplatten nach Zeissler und Fortner angelegt wurden. Die Bebrütung der beimpften Platten nach Zeissler wird im evakuierten Apparat vorgenommen. Der nach der Evakuierung noch verbleibende Restsauerstoff kann entweder durch Zusatz von Pyrogallol und KOH resorbiert werden oder aber man sorgt von vornherein für ein genügend großes Vakuum. Tatsächlich gediehen die von mir untersuchten Anaerobier im einfach evakuierten Topf ebenso gut wie in Kombination mit Pyrogallol und KOH.

Gegenüber dem Fortner'schen und damit dem Bachmann'schen Verfahren, die jederzeitige Prüfung des Oberflächenwachstums durch die Abschlußplatte hindurch gestatten, ist die Prüfung auf Wachstumskontrolle im Zeissler-Apparat durch das erforderliche Öffnen des Topfes wechselnden Druckschwankungen ausgesetzt.

Die anaerobe Kulturbedingung im Fortner-System ist dadurch geschaffen, daß gleichzeitig aerobe — also sauerstoffzehrende — als auch anaerobe Keime räumlich getrennt auf die gleiche Platte ausgesät werden. Fortner benutzt als Sauerstoffzehrer das Bact. prodigiosum, Bachmann wählt andere Aerobier, z. B. Staphylococcus aureus und B. coli, von Hefen: Bäcker- und Milchhefe als reduzierend wirkende Faktoren. Beide Methoden gewährleisten anaerobes Oberflächenwachstum durch Symbiose mit aeroben Stämmen bei scheinbar aeroben Lebensbedingungen. Das Wachstumsoptimum hängt dabei sowohl von der Sauerstoffzehrung als auch von der CO_2 Produktion der zur Symbiose verwendeten Stämme ab. Günstiges Wachstum ergibt sich nur bei bestimmter CO_2 Spannung und O Resorption. Daß eine bestimmte CO_2 Menge für das Wachstum notwendig ist, stellte Bachmann dadurch fest, daß er die gebildete CO_2 durch Natronkalk binden ließ; die Ergebnisse verschlechterten sich dabei

auffallend. Die früher bei mechanischer oder anderweitig chemischer Entfernung des Sauerstoffes zur Verfügung stehenden Reduktionsmittel genügten nicht, weil entweder ihr Reduktionsvermögen nicht ausreichte, oder weil sie auf das Wachstum eine Hemmung ausübten. Denn es ist absolut nicht gesagt, daß eine Substanz, die als starkes Reduktionsmittel wirkt, gleichzeitig ein guter Nährfaktor ist oder zum mindesten keinen hemmenden Einfluß auf das Wachstum ausübt; andererseits können weniger reduzierende Mittel sich besser als Nährstoff eignen. Bachmann dagegen benutzt in seinen Versuchen neben biologisch wirkenden Sauerstoffzehrern sowohl ausschließlich chemisch wirkende Reduktionsmittel: $Na_2 SO_3$ und Fe (OH)2, als auch diese in Kombination mit den biologischen. Mit diesen Versuchsanordnungen läßt sich der Sauerstoff soweit beseitigen, daß optimales Wachstum erfolgt.

Neben der Aufgabe die Anaeroben einfach zum Wachstum zu bringen, wird es aber öfters notwendig sein, daß Verfahren zur Verfügung stehen, die einerseits eine vollkommene Sauerstoffreiheit des Systems herstellen können, andererseits eine Variation der Sauerstoffspannung erlauben. In dieser Beziehung ist es gerade das Fortnersystem, das, wie Bachmann in speziellen Versuchen nachwies, sowohl eine Variationsbreite der O Spannung als auch der CO_2 Produktion durch quantitativ abgestufte Mengen der biologischen O-Zehrer erzeugen kann.

Eigene Versuche.

In meinen Versuchen verglich ich die praktische Ergiebigkeit des Fortner, Bachmann, und Zeissler'schen Systems. Als Untersuchungsmaterial wählte ich weniger streng obligate Anaerobier: den

I. **Fraenkel'schen Gasbrand** (Bac. Welchii),
II. **Pararauschbrandbazillus** (Vibr. septique),
III. **Rauschbrand** (Bac. Chauvoei),
als auch streng obligat anaerob wachsende:
IV. **Bac. Botulinus,**
V. **Tetanus,** und den
VI. **Novy'schen Bac. des malignen Ödems** (Bac. oedematiens). Als Sauerstoffverzehrer verwendete ich Bact. Prodigiosum, Staphylococcus aureus, Bact. coli, Bierhefe und Milchhefe, an chemisch reduzierenden Substanzen $Na_2 SO_3$ und Fe (OH)2.

Die **Technik** nach Fortner führte ich folgendermaßen aus: Als Nährboden diente mir 2% Trbz. Hammel- oder Schafblutagar. Ich wählte den Trbz. Zusatz, da nach den bisherigen Erfahrungen der Bakteriologie die meisten Anaerobier ihn als Energiequelle ausnützen können, außerdem Traubenzucker und Haemoglobin im luftverdünnten Raum an sich schon stark redu-

zierend wirken. Der Agar wurde in 1 cm hohe Petrischalen ausgegossen und 24 Stunden bebrütet zwecks Prüfung auf Sterilität und Verdunstung des, bei der geringen Höhe der Platten, reichlich gebildeten Kondenswassers. Um überhaupt die Bildung von Niederschlagswasser und damit von Kulturverunreinigungen von vornherein hintan zu stellen, verimpfte ich die Keime mehrfach auf frisch gegossene Platten und konnte ein ebenso günstiges Resultat wie nach vorheriger Bebrütung feststellen. Nach Vorbereitung der Platten schnitt ich mit einem sterilen Messer aus der Mitte des Nährbodens ein ½—1 cm breites Stück heraus, und zerlegte so die Platte in zwei getrennte Nährböden, um aerobe Verunreinigungen der anaeroben Kolonien zu vermeiden. Auf die eine Plattenhälfte impfte ich den Sauerstoffzehrer in dicker Schicht, auf die andere Seite den Anaerobier. Als Vorkultur diente mir 48stündige Tarozzi Bouillon, von der ich 1—2 Tropfen mit steriler Glaskapillare auf die eine Plattenhälfte brachte und mit sterilem Glasspatel ausstrich. Um von jeder Serie möglichst schöne Einzelkolonien zu erzielen, legte ich nebenher eine Platte an, auf der ich den Anaerobier in Verdünnung mit steriler NaCL 1 : 2 : 3 ausstrich. Nach Beimpfung der Platten wurden sie mit einer quadratischen Abschlußscheibe (Glasplatte) versehen. Im Winkel zwischen Glasplatte und Unterschale wurde das System mit Plastilin abgedichtet. Es folgte ein 48stündiger Brutschrankaufenthalt der Platten bei 37° C. Zur Technik des Verfahrens nach Fortner soll noch kurz bemerkt werden, daß sich, wie in der Literatur oft angegeben, gewisse **Schwierigkeiten** feststellen ließen, z. B. Verunreinigung der Kulturen durch überwuchernde Keime, die sowohl vom Plastilin als auch vom Arbeitstisch herrühren können. Wie auch in der Arbeit von Koch angegeben, ließen sich im Plastilin Keime, die die Platte überwuchert hatten, nachweisen. Die Schwierigkeiten können bei sorgfältig ausgeführter Arbeit aber vermieden werden, zum mindesten sehr herabgemindert werden. — Die **Verunreinigungen** können durch das bei der geringen Höhe der Petrischalen reichlich gebildete Kondenswasser so zustande kommen, daß die Keime vom Plastilin, damit vom Schalenrand, durch das Kondenswasser auf die Platte wandern. Um die Bildung des Kondenswassers zu vermindern, benutzte ich neben längerem Bebrüten vor Beimpfung der Platten, mehrfach 1,5 cm, also normal hohe Schalen, und bekam durchweg nicht wesentlich schlechtere Resultate. Um derartige Verunreinigungen der Platten zu vermeiden, bin ich so vorgegangen, daß alle oberflächlichen Keime sowohl des Plastilins als auch des Arbeitstisches und der Abschlußscheibe vernichtet wurden. Bevor ich die Versuche anstellte, wurde der Arbeitsplatz zunächst mit Sublimat abgewaschen. Die Abschlußscheiben und das schon ausgerollte Plastilin mit Alkohol abgewaschen und beides flüchtig in der Flamme getrocknet, darauf das Fortnersystem mit dem Plastilin verschlossen. In der größten Zahl der Fälle blieb eine Überwucherung, als auch eine Randverunreinigung vollkommen aus.

Die Versuchsanordnungen gliederte ich in vier verschiedene Reihen ein.

I. Reihe.

In der ersten Reihe wurden die angegebenen Anaerobier gleichzeitig mit einem der angegebenen biologischen Sauerstoffzehrer auf eine Platte geimpft. Nach 48stündiger Bebrütung jeweils mit dem Plattenmikroskop in Bezug auf Ausdehnung, Form und Art des Wachstums untersucht, außerdem wurde von jeder Platte ein mikroskopisches Präparat angelegt, um den Bazillus auf Versporung, Gramfärbung und Form zu prüfen. Es stellte sich in der einfachen Reihe folgendes Versuchsergebnis heraus.

	Prodigios.	Staph. aur.	Coli	Bierhefe	Milchhefe	Zeissler Topf
Fraenkel	2	3	(2)	2	(1)	3
	3	3	1	2	1	2
	2	2	1	2	(1)	2
Pararauschbrd.	2	2	2	2	∅	2
	2	2	(2)	2	∅	1
	1	1	(1)	1	((1))	2
Rauschbrd,	2	2	(2)	2	(1)	2
	2	3	(2)	2	∅	(2)
	2	2	1	2	((1))	2
Malign. Oedem	2	2	2	2	∅	2
	2	(1)	2	2	∅	(2)
	2	2	1	2	((1))	2
Botulinus	2	2	1	2	1	1
	2	2	2	2	(1)	2
	2	1	1	2	((1))	1
Tetanus	1	(1)	∅	1	((1))	(1)
	(1)	(1)	(1;	1	((1))	1
	2	(1)	∅	(1)	∅	∅

3 sehr gut; 2 gut; (2) weniger gut;
(1) mäßig; ((1)) schlecht; ∅ garnicht.

Die Bewertung stellte ich nach der Begünstigung des anaeroben Wachstums in Form von größerer Dichte der Kolonien und Einschränkung der wachstumsfreien Zone fest.

Es ergab sich also, daß mit **Prodigiosus** und **Bierhefe** durchweg **optimale** Wachstumsbedingungen geschaffen waren, sowohl bei den weniger streng als auch bei den streng obligaten Anaeroben. Den Bierhefe-Stamm hatte ich vorher auf Agar schräg Trbz. schwach sauer gezüchtet, da er hierauf am besten zu gedeihen schien. Mit **Staph. aur.** ergaben sich sehr **günstige** Bedingungen bei Fraenkel, Rauschbrand und Pararauschbrand, noch ziemlich günstige bei den streng obligaten. Mit **coli** allein erzielte ich **wechselnde** Resultate. Coli, ist also nur in beschränktem Um-

fange als Sauerstoffzehrer für die Züchtung von Anaerobiern geeignet. Schlechtes bis vollkommen **negatives** Wachstum ergab dagegen Symbiose mit **Milchhefe.** — Um einen Milchhefestamm zu erhalten, ließ ich rohe Milch einige Tage stehen, bis sich an der Oberfläche ein dichter Bakterienrasen gebildet hatte. Von verschiedenen Kolonien machte ich Gram-Präparate und stellte so Anwesenheit von Milchhefestäbchen fest. Aus den gewonnenen Mischkulturen erzielte ich durch mehrfache Reinzüchtung Milchhefestämme. — Nach Bachmanns Angaben bieten Hefestämme allein, — er benutzte Bäcker- und Milchhefe, — keine guten Wachstumsbedingungen. Er macht die lebhaftere CO_2 Produktion des Hefestammes für die hemmende Wirkung, die er auf das Anaerobierwachstum ausübt, verantwortlich. Er stellte entsprechende Kontrollversuche mit Prodigiosus Reinkultur an; da in diesen die schädliche Fernwirkung auf die Anaerobier ausblieb, bestimmte er in gesonderten Versuchen gasvolumetrisch die CO_2 Produktion und den Sauerstoffverbrauch gleicher Gewichtsmengen der Bäckerhefe und des Prodigiosus-Stammes. Es ergab sich, daß sowohl die Sauerstoff-Zehrung als auch die CO_2 Produktion des Hefestammes größer war und schneller von statten ging, als bei der Prodigiosus-Kultur. In weiteren Versuchen mit abgestuften Hefemengen zeigte sich, daß einzelne Anaerobier bei bestimmter Menge recht gutes Wachstum ergaben. Mit abgestuften Prodigiosus-Mengen erzeugte er ebenfalls ein Wachstumsoptimum.

Die erste Versuchsreihe ergibt also, daß im **Fortnersystem auf 2% Trbz. Hammelblut Agar** das **O** zehrende **Bakt. Prodigiosum** durch **Staph. aur.** und **Bierhefe** ersetzt werden kann, daß mit coli wechselnde Resultate erreicht werden, Milchhefe dagegen ein vollständiger Versager ist. Kontrollplatten im Zeissler-Topf ergaben bei Fraenkel gleich günstiges Wachstum wie mit Prodigiosus in der Fortner-Anordnung, mit den andern Anaerobiern wechselndes Wachstum, ähnlich dem bei coli und Staph. aur. im Fortnersystem.

II. Reihe.

In der zweiten oder kombinierten Reihe diente mir als O Zehrer: Bier oder Milchhefe in Symbiose mit einem Stamm von Bakt. Prodigiosum, Staph. aur., oder coli; und zwar strich ich sie in bestimmten Mengenverhältnis: 1 : 1 aus.

	Bierhefe + Prodigios.	Bierhefe + Staph. aur.	Bierhefe + Coli	Milchhefe + Prodigios.	Milchhefe + Staph. aur.	Milchhefe + Coli	Zeissler Topf	Fortner-System
Fraenkel	2	2	2	1	(2)	1	2	3
	2	2	1	1	1	∅	2	2
	2	2	(1)	(1)	(1)	(1)	2	2
Pararauschbrd.	2	2	(2)	(1)	1	∅	2	2
	1	(2)	(1)	1	1	((1))	1	2
	2	1	(1)	(1)	(1)	(1)	2	1
Rauschbrand	2	2	(1)	1	1	(1)	2	2
	(2)	(2)	1	1	(2)	∅	2	2
	1	(1)	(1)	(2)	(1)	1	(2)	2
Malign. Oedem	2	2	2	1	1	(1)	(2)	2
	2	2	∅	(2)	1	((1))	2	2
	2	(2)	(1)	∅	(2)	∅	2	2
Botulinus	2	(1)	((1))	∅	1	∅	1	2
	1	1	∅	(1)	(1)	((1))	(2)	2
	(1)	1	1	1	1	(1)	1	2
Tetanus	∅	((1))	∅	((1))	(1)	((1))	1	1
	(1)	(1)	∅	(1)	∅	((1))	(2)	2
	((1))	∅	((1))	((1))	((1))	∅	(1)	1

Es ergab sich, daß **Bierhefe in Symbiose mit einem andern biolog. O Zehrer gute Resultate** liefert, dagegen Milchhefe wieder vollständig versagt. Es kann vielleicht an den jeweilig benutzten Stämmen liegen, da nach Bachmanns Angaben Milchhefe in Symbiose mit Staph. aur. ein ausgezeichneter Sauerstoffzehrer ist. Bachmanns Versuche ergaben gutes Wachstum, wenn seine benutzten Hefestämme in Symbiose mit Staph. aur. verwandt wurden. Er führt das Ergebnis auf günstige Verhältnisse des O_2 Partiardruckes im anaeroben Plattensystem zurück, die jeder der benutzten O Zehrer für sich allein nicht oder nicht vollkommen zu erreichen scheint. Bei geeigneter Abstufung der Symbionten gelingt es, ein günstiges anaerobes Milieu herzustellen. Dasselbe Resultat trifft nach meinen Versuchen für die Bierhefe zu, die für sich getrennt aber ebenso günstige Resultate erzeugte; auch mit dem zur Symbiose benutzten O Zehrer Staph. aur. ergab sich allein ein gleich günstiges Wachstum. Kontrollplatten nach Fortner ergaben gleich günstige Resultate wie mit Staph. aur. und Bierhefe. Die Kontrollplatten im Zeissler-Topf verschiedenes Wachstum, ähnlich dem der Bierhefe in Symbiose mit Prodigiosus, Staph. aur. oder coli.

III. Reihe.

In der dritten und vierten Reihe wurden die anaeroben Kulturbedingungen allein oder in Kombination mit biologischen O Zehrern geschaffen. Nach Bachmann's Angaben benutzte ich $Na_2 SO_3$ und $Fe(OH)_2$, die beide reduzierend wirken, also den Sauerstoff des Systems absaugen. Die 3. Versuchsreihe führte ich so aus, daß ich eine mit gesättigter $Na_2 SO_3$ Lösung getränkte

Fließpapierscheibe auf die Abschlußplatte legte und den Verschluß des Systems genau wie sonst vornahm. Die Lösung stellte ich mir her, indem ich kristallisiertes $Na_2 SO_3$ im Überschuß in aqua. dest. löste.

Es ergaben sich folgende Resultate:

	$Na_2 SO_3$	$Na_2 SO_3$ + Prodigios.	$Na_2 SO_3$ + Staph aur.	$Na_2 SO_3$ + Coli	$Na_2 SO_3$ + Bierhefe	$Na_2 SO_3$ + Milchhefe	Zeissler Topf	Fortner-System
Fraenkel	3	2	(2)	(2)	2	1	2	3
	3	2	(2)	(2)	(2)	(2)	2	2
	2	2	2	1	1	(2)	2	2
Pararauschbrd.	2	2	2	(2)	2	(2)	2	2
	2	2	2	1	(2)	1	2	2
	2	2	2	1	2	(2)	2	2
Rauschbrand	2	2	2	(2)	2	(2)	2	2
	2	2	2	∅	(2)	(2)	1	2
	1	2	2	(1)	1	1	2	2
Malign. Oedem	2	2	2	2	3	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	(2)	2
	2	2	2	(2)	2	(2)	1	2
Botulinus	3	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	2	(1)	2	2	(1)	(2)
	(2)	2	2	((1))	2	(1)	1	2
Tetanus	1	2	2	3	(1)	2	1	2
	2	(2)	1	(2)	2	(1)	2	(2)
	2	2	(2)	1	2	(2)	(1)	1

$Na_2 SO_3$ ist also durchaus als optimal wirkender Faktor in Betracht zu ziehen.

Nach meinen Erfahrungen zeigt sich $Na_2 SO_3$ durchweg sowohl als gutes Reduktionsmittel wie auch als guter Nährfaktor. Die Fortneranordnung ergibt Begünstigung des Anaeroben-Wachstums gegenüber der Kontrollplatte im Zeissler-Topf in Form von größerer Dichte der Kolonie, vor allem Verkürzung der wachstumsfreien Zone. Wie mir überhaupt eine größere Wachstumsausdehnung und üppigeres Wachstum auf Fortner und Bachmann Platten gegenüber den Zeissler'schen — bei vollständig gleicher Beimpfung — auffiel, und es sich nicht um überwuchernde Keime handelte, wie ich mikroskopisch feststellte. $Na_2 So_3$ kann sowohl **allein als auch in Kombination mit anaeroben Bakterien** das Bakt. Prodigiosum des Fortnersystems vertreten, indem es **optimale Wachstumsbedingungen** zeitigt. Nach Bachmann ergaben sich die besten Resultate mit $Na_2 SO_3$ allein oder in Kombination mit Prodigiosus und coli, was nach meinen Versuchen für coli nicht ganz zutrifft, denn in Gemeinschaft mit coli und Milchhefe wurden auch noch günstige, doch immerhin wechselnde Resultate erzielt. Das die Milchhefe zusammen mit $Na_2 SO_3$ ein relativ günstiges Ergebnis erzeugt, kann auf Wegnahme von Aldehyden, die im Hefestoffwechsel entstehen, zurückgeführt werden.

Kontrollplatten nach Fortner ergaben gleiches Wachstum wie mit $Na_2 SO_3$ allein oder in Kombination mit Prodigiosus. Im Zeissler-Topf erzielte ich gleiche Resultate wie in Kombination mit $Na_2 SO_3$ + coli oder Staph. aur.

IV. Reihe.

In der vierten Reihe trat an Stelle des $Na_2 SO_3$ das **Fe (OH)2.** Dem $Na_2 SO_3$ gegenüber hat es aber allein den rein technischen Nachteil, daß es sowohl schwieriger herzustellen, als auch unsauberer im Gebrauch ist. Zur Herstellung benutzte ich ein Ferrosalz Fe SO4, das ich in aqua dest. löste, und 20 % KOH, beides in der Hitze zusammengegeben, darauf filtriert, legte dann eine Fließpapierscheibe auf die Abschlußplatte des Systems und strich das gewonnene Fe (OH)2 mit einem Spatel in dicker Schicht auf. Da das Fe (OH)2 sich ungeheuer schnell oxydiert, schon unter der Herstellung beginnt es sich braun zu verfärben, muß seine Verwendung ziemlich rasch vor sich gehen.

	$Fe(OH)_2$	$Fe(OH)_2$ + Prodigios.	$Fe(OH)_2$ + Staph. aur.	$Fe(OH)_2$ + Coli	$Fe(OH)_2$ + Bierhefe	$Fe(OH)_2$ + Milchhefe	Zeissler Topf	Fortner-System
Fraenkel	3	2	2	2	2	2	2	3
	2	2	2	2	2	(2)	2	2
	2	3	2	(2)	2	1	2	2
Pararauschbrd.	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	2	2	(2)	(2)	(2)	1	2
	(2)	2	2	1	1	(1)	2	1
Rauschbrand	∅	2	1	1	(2)	(1)	2	2
	(2)	2	1	1	1	(1)	2	2
	1	2	(2)	1	1	(1)	2	2
Malign. Oedem	3	3	2	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	(2)	2	(2)	2
	2	2	2	(2)	2	1	2	2
Botulinus	2	2	2	1	2	1	1	2
	(2)	2	(2)	1	(2)	(2)	2	2
	1	2	1	2	1	(1)	1	1
Tetanus	1	3	2	1	2	1	1	2
	(2)	(2)	2	1	2	(2)	(1)	(2)
	1	2	(2)	(2)	(2)	(1)	(1)	1

Praktisch wichtig ist demnach, daß das **Fe (OH)2 allein,** wie auch in **Kombination mit biologischen O-Zehrern,** dieselben **günstigen Wachstumsbedingungen** erzielen **kann, wie das $Na_2 SO_3$.** Es kam dies vor allem bei Züchtung von Fraenkel'schem Gasbrand und dem Novy'schen Bac. des malignen Oedems zum Vorschein, wohingegen die Resultate beim Rauschbrand, Bac. Botulinus und Tetanus wechselndere Ergebnisse sehen ließen.

Nach Bachmann ist Fe (OH)2 noch besser zur Züchtung der Anaerobier geeignet als $Na_2 SO_3$, was sich in meinen

Versuchen nicht ganz bewährte. Fe (OH)2 scheint im allgemeinen ein besseres Reduktionsmittel als Nährsubstrat zu sein, wenigstens schuf es nicht mit solcher Regelmäßigkeit wie Na_2 SO_3 optimale Bedingungen. Entgegen den Angaben von Bachmann, der mit Fe (OH)2 allein auf unfiltriertem Levinthalagar bestes Wachstum erzielte, stellte ich fest, daß auf 2% Trbz. Blut-Agar, — mit dem ich meine Versuche anstellte, — die Wachstumsbedingungen von Fall zu Fall, d. h. bei den verschiedenen geprüften Anaerobiern verschieden waren. Vielleicht mag das an zufällig ungünstigen Wachstumsbedingungen gelegen haben, ich möchte im allgemeinen doch annehmen, daß Na_2 So_3 sich besser als maximal ergiebiger Faktor eignet und für die praktische Anaerobenzüchtung unter den chemischen Mitteln wohl hauptsächlich in Betracht kommt; es hat die Vorzüge billig und sauber im Gebrauch und leicht herstellbar zu sein. Kontrollplatten nach Fortner verhielten sich wie die Ergebnisse beim Traenkel, Pararauschbrand und malignem Oedem, die Zeissler'schen Kontrollplatten durchweg wie die Resultate beim Pararauschbrand.

Kulturelle Eigenschaften der Anaerobier.

Nachdem ich die Platten in Bezug auf Wachstumsoptimum in den einzelnen Reihen untersucht hatte, schloß ich jeweils eine Bestimmung der kulturellen Eigenschaften und der mikroskopischen Diagnostik der einzelnen Anaerobier an. Obschon ich mir bewußt war, daß dieser Teil der Untersuchungen nicht unbedingt oder vielmehr nicht einmal bedingt zum Thema meiner Arbeit gehörte, erschien er mir immerhin so interessant, daß ich es für wert hielt, mich näher mit ihm zu beschäftigen. Es mag an dieser Stelle eine kurze Übersicht über meine Beobachtungen folgen.

Die Untersuchung der 48 Stunden lang bebrüteten Platten mit dem **Plattenmikroskop** ergab bei einigen der beobachteten Anaerobier, daß die Oberflächen-Kolonien eine **abweichende Wuchsform** annahmen, gegenüber dem als typisch beschriebenen Wachstum nach Zeissler. Vielleicht mag das auf einem anderen O Potential im Fortner-System gegenüber dem im Zeissler-Topf beruhen, vielleicht an irgendwie fremden Substanzen der chemischen oder biologischen O Zehrer.

Fraenkel'scher Gasbrand.

Die Kolonien des Fraenkel'schen Gasbrands zeigten typisches Wachstum auf der Trbz.-Blut-Agar-Platte. Sie waren knopfförmig erhaben, anfangs gelblich, bei längerem Stehen gingen sie über lehmbraun und grau in olivgrün über. Sie waren von einem kreisrunden undurchsichtigen Hof umgeben, der nach Zeissler sein Entstehen den proteolytischen Fermenten und dem Hämotoxin des Fraenkel'schen Gasbrands, seine schmutzigbraune Farbe und Undurchsichtigkeit der beim Wachstum der Kolonie aus dem Traubenzucker gebildeten Säure (Buttersäure) verdankt. Die

Kolonien waren klein (mittelgroß) bis gut stecknadelknopfgroß. Auf besonders dicht ausgesäten Platten zeigte sich Rasen bezw. Schleierbildung; diese waren nicht durch Überwuchern vorgetäuscht, wie das mikroskopische Bild ergab, sondern von den gleichen Stäbchen des Fraenkel'schen Gasbrands gebildet. Diese Stäbchen waren plump, breit, gelegentlich nur kokkengroß, dagegen häufiger mittelgroß bis fadenförmig. Das Verhalten bei der Gramfärbung wechselte sowohl bei den Kolonien derselben Platte, als auch der einzelnen Platten untereinander. Es kamen meist grampositive Stäbchen vor, daneben bald mehr, bald weniger gramnegative.

Pararauschbrand.

Der Pararauschbrand wuchs zum Teil in langgestreckten erhabenen Kolonien mit haemolytischen Höfen und zarten Ausläufern, die ein filziges Geflecht bildeten. Auf den gleichzeitig angelegten Platten nach Fortner und Bachmann als flache gräuliche Kolonien, die von breiten goldgelben haemolytischen Höfen umgeben waren. Sie hatten runde bis weinblattartige Form und keine feinen Ausläufer. Mikroskopisch ergab sich bei beiden Arten ein schlankes Stäbchen mit abgerundeten Ecken von wechselnder Breite und Länge, von einem bis zum andern Extrem, außerdem zeigten sich einige Blähformen. Die Sporen mittel- bis endständig, daneben viel freie. In 48 St. Tarozzi-Bouillon stark versport, dagegen auf der Trbz.-Blut-Agar-Platte nur schwach. Die starke Versporung führt man auf eiweißreiche Nährmedien zurück, schwächer und unvollkommener erfolgt sie in kohlehydrathaltigen. Die Gramfärbung ergab sich wieder wechselnd, Bakterien derselben Kolonie vorwiegend grampositiv mit einzelnen gramnegativen Stäbchen.

Rauschbrand:

Die Wuchsform des Rauschbrands war rund bis weinblattartig mit geringer kreisförmiger Hämolyse, teils feine Ausläufer bildend, teils ohne Randausläufer; Kolonien und Rasen waren in den Nährboden eingesunken. Der Rasen war von graugelblicher Farbe und zeigte vorwiegend runde Kolonien, in anderen Fällen war er verfilzt, aus einzelnen Flechten bestehend, wohingegen die Einzelkolonien scharf begrenzt waren und Ausläufer hatten. In der Tarozzi-Bouillon zeigte sich wieder starke Sporenbildung, auf der Trbz.-Blut-Agar-Platte nur geringe Versporung. Verhalten der Gramfärbung wie vor.

Malignes Ödem:

Der Novy'sche Bacillus wuchs in einzelnen Kolonien und Rasenform, sie setzten sich aus einem Geflecht von Schlingen zusammen, die den Eindruck machten, als ob sie sich in der Mitte kreuzten und dadurch die hügelige Anschwellung der Kolonie bewirkten. Im Bereich des Wachstums Haemolyse des Nähr-

bodens. Mikroskopisch fanden sich kurze, längere und fadenförmige Individuen, oft waren die Stäbchen gekrümmt und lagen in mehreren Gliedern hintereinander. Im Bacillenleib fanden sich mittel- bis endständige große ovale Sporen; in Tarozzi-Bouillon wieder stark versport, weniger auf der Platte. Verhalten nach Gram wie vor.

Bac. Botulinus:

Die Wuchsform von Bac. Botulinus zeigt leicht erhabene Kolonien mit feinen Ausläufern, das Zentrum der Kolonie war nicht scharf begrenzt, es rief wieder den Eindruck hervor, als ob es aus sich kreuzenden Schlingen bestände. Die Kolonien waren leicht in den Nährboden eingesunken und von durchsichtigen hämolytischen Höfen umgeben. Mikroskopisch ergaben sich mittelgroße breite, vorwiegend grampositive Stäbchen mit abgerundeten Ecken, vereinzelte außerordentlich große und dicke Individuen. Sie bildeten mittel- bis endständige Sporen, nur vereinzelte freie auf der Trbz.-Blut-Agar-Platte. In Tarozzi-Bouillon wieder viel freie wie auch intracelluläre Sporen. Die Gramfärbung ergab wieder vorwiegend grampositive Stäbchen.

Tetanus:

Ganz typisches Wachstum zeigte der Bact. tetani. Er bildete einen Bakterienrasen mit ganz zarten Ausläufern, die oft gerade nur eben mit dem Plattenmikroskop zu erkennen waren. Mikroskopisch erschien er als schlankes Stäbchen mit abgerundeten Ecken, mehr oder weniger lange Fäden bildend. Die runden endständigen Sporen fanden sich wieder sehr zahlreich in Tarozzi-Bouillon, weniger auf den Trbz.-Platten. Verhalten der Gramfärbung gegenüber wieder wie vor.

Zusammenfassendes Versuchsergebnis.

Die praktischen Versuchsergebnisse lassen sich dahin zusammenfassen, daß

1. das Fortner- und damit das Bachmann'sche Verfahren rein **technische Vorteile gegenüber** dem Zeissler'schen haben, und daß sie **kulturell bessere,** zum mindesten gleichwertige **Resultate** erzeugen;

2. daß das **O-zehrende Bakt. Prodigiosum** des Fortner-Systems auf **2% Trbz.-Blut-** (Hammel od. Schaf) **Agar** durch einen **Bierhefe-Stamm** oder durch **Staph. aur.** gleichwertig **ersetzt** werden kann; **Bakt. coli** dagegen wechselnde Erfolge zeitigt und für die praktische Anaerobenzüchtung also weniger in Betracht kommt. Milchhefe dagegen negative Resultate auf 2% Trbz.-Blut-Agar ergibt.

3. Daß Kombinationen von Bier-, vor allem Milchhefe, mit andern biologischen O-Zehrern auch nicht geeignet sind, auf den benutzten Nährböden gute Resultate zu erzeugen, ausgenommen die Kombination von **Bierhefe und Staph. aur.**

4. Daß das $Na_2 SO_3$ sowohl **allein** als auch in **Kombination** mit **Bakterien ausgezeichnete Erfolge** in der benutzten Versuchsanordnung ergibt.

5. Daß mit **$Fe(OH)_2$ bei** Fraenkel und Novy **optimale** Wachstumsbedingungen gezeitigt werden können.

Am Schlusse dieser Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. K. W. Jötten, Direktor des Hygienischen Institutes, für die freundliche Überlassung des Themas. Ebenso spreche ich Herrn Dr. habil. H. Reploh und Herrn Professor Dr. med. Fr. Sartorius meinen Dank aus für die Anregungen bei der Ausführung der Arbeit.

Literaturverzeichnis.

Bachmann: „Experimentaler Beitrag zur anaeroben Oberflächenkultur.“ Zentralblatt f. Bakt. Bd. 132. Originale. S. 366.

Frei W. und Riedmüller L.: „Die Verwendung d. Zysteins bei der Anaerobenzüchtung.“ Zentralblatt f. Bakt. Bd. 119 Originale. S. 282.

Frei W. und Riedmüller L.: „Reduktionspotential und Anaerobenzüchtung.“ Zentralblatt f. Bakt. Bd. 121. Originale. S. 97.

Friedberger E. und Reiter H.: „Die allgemeinen Methoden der Bakteriologie.“ Handbuch d. pathogen. Mikroorganismen. W. Kolle u. A. v. Wassermann. II. Auflage, Gustav Fischer, Jena. 1912 Bd. I. S. 293.

Jusatz H. J.: „Zur Technik des Fortner'schen Anaerobenzüchtungsverfahrens.“ Zentralbl. f. Bakt. Bd. 127. Originale. S. 212.

Koch E.: „Einfache Anaerobenzüchtung in Petrischalen.“ Zentralbl. f. Bakt. Bd. 132. Originale. S. 358.

Reichenbach: „Allgemeine Morphologie und Biologie der Bakterien.“ Handbuch der Mikrobiologie von Friedberger und Pfeiffer. Verlag Gustav Fischer, Jena. 1919. Bd. I. S. 92.

Ritter W. und Dorner W.: „Behebung eines wichtigen Nachteils des anaeroben Pyrogallolverschlusses.“ Zentralblatt f. Bakt. Bd. 125. Originale. S. 379.

Schmidt E.: „Beitrag zur Anaerobenzüchtung.“ Zentralbl. f. Bakt. Bd. 127. Originale. S. 378.

Zeissler J.: „Die Technik der Anaerobenzüchtung.“ Handbuch d. Mikrobiologischen Technik. Bd. II von Kraus und Uhlenhuth. Verlag Urban u. Schwarzenberg. 1923. S. 961.

Zeissler J.: „Anaerobenzüchtung.“ Handbuch d. pathogenen Mikroorganismen von Kolle, Kraus, Uhlenhuth. Bd. IV 2 S. 1099. Verlag Gustav Fischer u. Urban u. Schwarzenberg. 1930.

Lebenslauf.

Am 7. März 1910 wurde ich als Tochter des Fabrikanten Berthold Wichmann zu Münster i. Westf. geboren.

Nachdem ich Ostern 1930 auf dem Marien-Oberlyzeum zu Münster i. Westf. meine Reifeprüfung abgelegt hatte, widmete ich mich daselbst dem Studium der Medizin. Ich legte Herbst 1932 die ärztliche Vorprüfung ab und bestand Dezember 1935 das medizinische Staatsexamen mit dem Prädikat sehr gut.

Seit dem 20. XII. 1935 bin ich Medizinal-Praktikantin in der Universitäts-Augenklinik, Münster.